

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 509 338 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **92105737.8**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 9/127, A61K 7/00**

(22) Anmeldetag: **03.04.92**

(30) Priorität: **12.04.91 DE 4111982**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**21.10.92 Patentblatt 92/43**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC  
NL PT SE**

(71) Anmelder: **Merz & Co. GmbH & Co.  
Eckenheimer Landstrasse 100-104  
W-6000 Frankfurt/M. 1(DE)**

(72) Erfinder: **Mentrup, Edgar, Dr.  
Parcusstrasse 5  
W-6500 Mainz(DE)  
Erfinder: Michel, Cristoph  
Lilistrasse 56  
W-6050 Offenbach(DE)  
Erfinder: Purmann, Thomas, Dr.  
Schlotfegergrund 6a  
W-8750 Aschaffenburg(DE)**

(74) Vertreter: **Beil, Hans Chr., Dr. et al  
Beil, Wolff und Beil, Rechtsanwälte  
Adelonstrasse 58 Postfach 80 01 40  
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

(54) **Stabile kleinpartikuläre Liposomenzubereitungen, deren Herstellung und Verwendung.**

(57) Die Erfindung betrifft Liposomenzubereitungen, deren Herstellung und Verwendung, enthaltend ein Lezithin mit 1-90% fettsäureverestertem Collagenhydrolysat, gegebenenfalls herkömmliche Gelbildner, Zusatzstoffe und pharmazeutische Wirkstoffe, mit einer konstant geringen Vesikelgröße und hoher Stabilität.

**EP 0 509 338 A1**

Liposomen sind, wie allgemein bekannt, kleine Vesikel mit Bilayerstruktur. Sie finden im pharmazeutischen Bereich Anwendung als Arzneistoffträger, z.B. zur parenteralen oder topischen Applikation.

Wirkstoffe mit unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften können in Liposomen eingearbeitet werden. Wasserlösliche Wirkstoffe sind im Innenraum der Vesikel und zwischen den Bilayerlamellen zu finden. Lipophile Substanzen dagegen interkalieren in den Bilayer. Arbeitet man daher größere Mengen solcher Wirkstoffe in Liposomen ein, kann sich der Durchmesser der Vesikel deutlich vergrößern. In diesem Fall können sich pharmakokinetische und somit auch therapeutische Eigenschaften wesentlich ändern. Kleine Liposomen sind häufig vorteilhaft, da sie nicht durch das reticulo-endotheliale System (RES) erkannt werden und somit nicht in Leber oder Niere aus dem Blutkreislauf ausgefiltert werden. Dadurch können Plasmaspiegel über längere Zeit erhalten werden. Beispielsweise wurde für solche Liposomen eine Halbwertszeit von über 20 Stunden ermittelt (vgl. J. Senior et al., Biochim. Biophys. Acta 839, 1 (1985)). Dies bedeutet eine erhöhte Verfügbarkeit eines verkapselten Wirkstoffs am potentiellen Wirkungsort, z.B. einem Tumorgewebe. Denn das zirkulierende Liposomendepot wird durch enzymatischen Abbau und Wechselwirkung mit anderen Blutbestandteilen nur langsam abgebaut. Dabei wird der verkapselte Wirkstoff freigegeben und kann für therapeutische Zwecke zur Verfügung stehen.

Große Vesikel dagegen werden durch das RES, besonders durch die Kupferzellen der Leber, als Fremdkörper erkannt und zerstört. Bereits wenige Minuten nach der i.v.-Applikation solcher Partikel sind zum Teil über 90% der Partikel ausgefiltert. So wurde nach der Applikation von 400 nm großen Liposomen eine Halbwertszeit von ca. 10 min gefunden, bei Partikeln der Größe 1000 nm betrug sie nur noch ca. 5 min (vgl. J. Senior et al., a.a.O., und P.O. Leikes, Liposome Technology, Vol. 1). Auch nach topischer Applikation können kleine wirkstoffhaltige Vesikel u.U. durch eine verbesserte Penetration z.B. längs der Haarfollikel eine verbesserte Wirkung zeigen. Ferner besteht die Möglichkeit einer Interaktion mit den in den interzellulären Zwischenräumen befindlichen natürlichen Bilayerstrukturen (vgl. W. Curatolo, Pharm. Res. 4, 271-341 (1987), G. Grubauer et al., J. Lipid Res. 30, 89-96 (1989)). Zudem kann bei einer unilamellaren Struktur der Vesikel im Vergleich zu multilamellaren großen Vesikeln statistisch gesehen eine vermehrte Interaktion mit anderen Zellen erfolgen. Dadurch ist ein erleichterter Transfer von Membranbestandteilen, z.B. verkapselten Wirkstoffen, möglich.

In der FR-A 2 591 105 werden pharmazeutische Zusammensetzungen auf der Basis von lipidhaltigen multilamellaren Vesikeln zur dermatologischen oder kosmetischen Anwendung beschrieben, welche ein Retinoid oder ein Analogon hiervon enthalten. Durch diese Kombination sollen Irritationen auf der Haut vermieden werden. Als Vesikelbestandteile kommen dabei hydrierte Lipide und z.B. Cholesterol oder Sitosterol, zum Einsatz. Die daraus hergestellten Liposome weisen jedoch eine hohe Teilchengröße und die damit verbundenen Nachteile auf. Insgesamt sind daher Partikel geringer Größe erstrebenswert.

Neben der Teilchengröße ist auch die Stabilität der Liposomenzubereitung von entscheidender Bedeutung für eine therapeutische oder kosmetische Verwendung derselben.

Aus galenischer Sicht problematisch und für therapeutische Anwendungen häufig limitierend ist dabei die Instabilität von Liposomenzubereitungen, und zwar einerseits hinsichtlich der Partikel selbst und andererseits hinsichtlich des eingearbeiteten Wirkstoffs. Im Vordergrund steht zunächst eine Zersetzung des Wirkstoffs. Art und Geschwindigkeit der Zersetzung sind für jeden Wirkstoff spezifisch. Oxidative Prozesse können durch geeignete Antioxidantien, wie Butylhydroxytoluol oder Vitamin E, reduziert werden. pH-abhängige Hydrolyseprozesse sind durch eine geeignete Pufferung reduzierbar. Bei hydrolyseempfindlichen Wirkstoffen kann durch den verstärkten Kontakt der Substanz mit Wasser eine erhöhte Hydrolyse auftreten, jedoch besteht durch ausreichende Einlagerung in den Bilayer die Möglichkeit der Stabilisierung. Entscheidend für die Wirkstoffstabilität sind die jeweilige Zersetzungsreaktion und die physiko-chemischen Eigenschaften der Substanz.

Neben der Wirkstoffzersetzung kann, wie oben erwähnt, eine Beeinträchtigung der Liposomen selbst durch Lipidoxidation, Lipidhydrolyse und Teilchenaggregation auftreten. Die Lipidoxidation kann durch den Zusatz von Antioxidantien vermindert werden, wie beispielsweise von C.A. Hunt, S. Tsang., in Int.J.Pharm. 8, 101 (1981) oder von A.W.T. Konings in Liposome Technology, Vol. I, beschrieben. Alternativ besteht die Möglichkeit, für Liposomen Lezithine mit gesättigten Fettsäureestern einzusetzen, die nicht oxidiert werden können (vgl. P. Kibat, Dissertation, Universität Heidelberg 1987). Eine Hydrolyse der Lezithine zu Lyssolezithinen kann zusätzlich durch Pufferung der Systeme im Bereich von pH 6-7 verringert werden (vgl. S. Froeckear et al., Optimization of Drug Delivery, A. Benzon Symposium 17, Kopenhagen (1982)).

Darüberhinaus kann vor allem bei kleinen unilamellaren Vesikeln bereits nach wenigen Wochen eine unerwünschte Teilchenaggregation auftreten. Dadurch verändern sich die Eigenschaften der Vesikel während der Laufzeit eines Produktes. Bisher bekannte Möglichkeiten gegen solche Veränderungen sind wiederum der Einsatz hydrierter (gesättigter) Lipide oder von Cholesterol bis zu 50 Mol-% bezüglich der Lipidgesamtmenge (vgl. P. Kibat, a.a.O.). Nachteilig erwies sich dabei jedoch die Zunahme der Teilchengröße.

Bei Verwendung hydrierter Lipide. Zudem weisen hydrierte Lipide meist eine erhöhte Phasenübergangstemperatur von 50 bis 60 °C auf, während diese bei herkömmlichen Lezithinen, z.B. bei Phosphatidylcholin, -15 bis 30 °C beträgt (vgl. B.D.Ladbrooke, D. Chapman, Chem. Phys. Lipids 3, 304 (1969)). Zur Herstellung von Liposomen muß aufgrund des erforderlichen fluiden Membranzustandes oberhalb der Phasenübergangstemperatur gearbeitet werden. Dabei ist die Handhabung der Materialien im Falle hydrierter Lipide technisch erschwert. Ferner sind hydrierte Lipide, da es sich um synthetische Substanzen handelt, aus toxikologischer Sicht bedenklicher als native Lezithine aus Eiern oder Sojapflanzen.

Bei einem Einsatz von Cholesterol zur Stabilisierung ist der meist reduzierte Einbau lipophiler Wirkstoffe aufgrund einer kompetitiven Verdrängung durch Cholesterol problematisch (vgl. E. Mentrup, Dissertation, Universität Heidelberg, 1988). In Abhängigkeit von den Stoffeigenschaften ist u.U. kein Einbau von therapeutisch wirksamen Mengen möglich.

Aufgabe vorliegender Erfindung ist es daher, Liposomenzubereitungen bereitzustellen, die eine kleine, im wesentlichen konstante, Teilchengröße aufweisen und insgesamt stabil sind, wobei keine Zersetzung eines eventuell eingearbeiteten Wirkstoffs erfolgt. Ferner sollen sowohl bei der topischen therapeutischen als auch bei der kosmetischen Anwendung keine toxischen Irritationen auf der Haut auftreten.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man als Ausgangsmaterial für die Liposomenherstellung ein Lezithin wählt, dem 1 bis 90% fettsäureverestertes Collagenhydrolysat zugesetzt sind.

Als Liposomenbaustein besonders geeignet ist hierbei Soja- oder Eilezithin. Neben diesen beiden nativen Lezithinen eignen sich besonders auch andere synthetisch hergestellte oder native C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>-Phosphatidylcholine, wobei der Fettsäureanteil gesättigt oder ungesättigt sein kann. Hierin werden vorzugsweise 10 bis 50% des fettsäureveresterten Collagenhydrolysats eingearbeitet. Insbesondere bevorzugt ist dabei ölsäureverestertes Collagenhydrolysat (ÖKH). Dieses Material ist ein amphiphiles Tensid, das in fester Form vorliegt. Es wird zwar in pharmazeutischen und kosmetischen Cremes schon als Stabilisator verwendet, jedoch zur Stabilisierung von Liposomen bisher nicht eingesetzt.

Die Gesamtkonzentration von Lezithin und Collagenhydrolysat in der erhaltenen wäßrigen Dispersion liegt zwischen 5 und 350 mg/ml, vorzugsweise zwischen 20 und 180 mg/ml. Dies entspricht etwa 0,5 bis 35% bzw. bevorzugt 2-18% Lezithin/Collagenhydrolysat in der Liposomenzubereitung. Durch die Verwendung von Collagenhydrolysat, insbesondere von ÖKH, werden die erzeugten Liposomen deutlich kleiner als ohne diesen Zusatz, was die oben beschriebenen Vorteile mit sich bringt. Dieser Effekt wurde bisher bei wirkstoffhaltigen Liposomen nicht erzielt. Lediglich bei Wirkstoff-Freiheit kann durch den Zusatz einiger anderer Substanzen mit amphiphilem Charakter eine Teilchengrößenverringerung erreicht werden. In der nachfolgenden Tabelle 1 ist der Einfluß verschiedener, in der Liposomentechnologie üblicher Substanzen auf die Teilchengröße der mit einem Hochdruckhomogenisator, also nach jeweils gleichem Verfahren, hergestellten Liposomen aufgeführt. Stellt man andererseits große Liposomen aus Sojalezithin durch die Schüttelmethode her (vgl. A.D. Bangham et al., J. Mol. Biol. 13, 238 (1965)), so sind die Liposomen bei dem Zusatz einer amphiphilen Substanz (z.B. bei Cholesterin) deutlich größer als die ursprünglichen Teilchen. Der erfindungsgemäße Zusatz von Collagenhydrolysat und besonders von ÖKH führt jedoch auch hier zu einer deutlichen Verringerung der Teilchengröße, wie nachstehend aufgezeigt. Der Einfluß auf die Teilchengröße ist also verfahrensunabhängig und nur substanzabhängig.

Tabelle 1

Einfluß verschiedener Substanzen auf die Teilchengröße von wirkstoff-freien Lipidvesikeln			
(Herstellung: Hochdruckhomogenisator, 30 Min. 1,4 · 10 <sup>8</sup> Pa)			
Konzentration Sojalezithin (mg/ml)	Lipidzusatz	Konzentration Lipidzusatz (mg/ml)	Teilchengröße nm
100	-	-	40±10
80	ÖKH	20	25±4
80	mittelkettige Triglyceride	20	71±15
80	Squalan	20	57±12
80	Cholesterin	20	58±14
80	Polyoxyethylenoleylether	20	34±7
80	Polysorbat 80	20	24±4
96	Polysorbat 80	4	25±5

Als einziges Tensid führt Polysorbat 80 auch zu einer deutlichen Reduzierung der Teilchengröße.

jedoch nur bei wirkstofffreien Liposomen (vgl. B. Kronberg et al., J. Pharm. Sci., 79 (8), 667-71 (1990). Bei wirkstoffhaltigen Liposomen, z.B. mit Tocopherolnicotinat, Hexachlorophen, führt dagegen ein Zusatz von Polysorbat (z.B. 20%) zu einer deutlichen Teilchengrößenerhöhung mit einer zusätzlich uneinheitlichen Verteilung, weshalb dieser Zusatz nicht geeignet ist zur Herstellung pharmazeutisch stabiler Produkte.

Wie erwähnt, erfolgt bei der erfindungsgemäßen Verwendung von fettsäureverestertem Collagenhydrolysat eine Reduzierung der Vesikelgröße auch bei gleichzeitiger Einarbeitung lipophiler Therapeutika. Als lipophile Wirkstoffe zur Einarbeitung können beispielsweise Aknetherapeutika wie Hexachlorophen, Tretinoin, oder Minocyclin verarbeitet werden. Aber auch der Einbau anderer topisch applizierbarer Wirkstoffe wie alpha-Tocopherolnicotinat, Tromantadin-Base, Croconazol, Minocyclin, Meclocyclin, Cyproteron, Cyproteronacetat, Corticoiden, 2-tert.-Butyl-4-cyclohexylphenylnicotinat-N-oxid, Corticosteroiden, Androgenen, Ethinylöstradiol, nichtsteroidalen Antiphlogistika, Dihydropyridinen, Spironolacton, Erythromycinester, lipophilen Lokalanästhetika, Östradiolester oder lipophilen Antihistaminika ist möglich.

Der Wirkstoffgehalt kann entsprechend den therapeutischen Anforderungen variieren. So können z.B. pro 100 g mit fettsäureverestertem Collagenhydrolysat oder mit ÖKH versetztes Lipid 10 mg bis zu 50 g Wirkstoff eingesetzt werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, derartige Wirkstoffe in Liposomen mit sehr geringem Durchmesser zu verarbeiten. Aufgrund der allgemeinen Vesikelgröße ist eine Steigerung der therapeutischen Aktivität aufgrund des geringen Durchmessers möglich.

Besonders vorteilhaft bei dem Zusatz von fettsäureverestertem Collagenhydrolysat zu Lezithinliposomen ist, daß sich die gewünschte Teilchengröße durch unterschiedliche Zusatzmengen in einem weiten Bereich steuern läßt, wie dies aus der nachfolgenden Tabelle 2 ersichtlich ist.

Tabelle 2

Einfluß des ÖKH-Anteils auf die Teilchengröße Tocopherolnicotinat-haltiger Liposomen		
(Herstellung: Hochdruckhomogenisator (30 min, $1,4 \cdot 10^8$ Pa)		
Konzentration Sojalezithin (mg/ml)	Konzentration ÖKH (mg/ml)	Teilchengröße (nm)
100	-	$51 \pm 14$
80	20	$42 \pm 17$
50	50	$25 \pm 5$
20	80	$26 \pm 5$

Anhand nachfolgender Tabelle 3 kann man erkennen, daß der Zusatz von ÖKH auch bei zunächst größeren Liposomen, gewonnen durch die Herstellungsmethode Ethanolinjektion, eine Steuerung der Teilchengröße zuläßt.

Tabelle 3

Einfluß des ÖKH-Anteils auf die Teilchengröße wirkstoff-freier Liposomen		
(Herstellung: Ethanolinjektion gemäß Beispiel 6)		
Konzentration Sojalezithin (mg/ml)	Konzentration ÖKH (mg/ml)	Teilchengröße (nm)
32	-	$637 \pm 309$
32	8	$175 \pm 106$
24	12	$109 \pm 26$
24	24	$99 \pm 26$

Wie aus den Tabellen 2 und 3 ersichtlich ist, hängt bei wirkstoffhaltigen Liposomen das Ausmaß der Teilchengrößenreduktion vom Wirkstoff ab.

Wesentlich für eine breite Anwendung von Liposomen ist die bereits beschriebene Lagerungsstabilität der Liposomen. Wichtigster physikalischer Parameter für die Lagerungsstabilität ist die Teilchengröße der Vesikel. Die besonders bei Lezithinen auftretende Aggregation der Vesikel kann durch einen geeigneten Zusatz von fettsäureverestertem Collagenhydrolysat deutlich verringert werden, wie in nachfolgender Tabelle 4 gemäß Beispiel 2 nachgewiesen. Entsprechende Liposomen sind erfindungsgemäß daher sowohl primär kleiner, als auch bei Lagerung stabil. Ein evtl. aufgrund der Aggregation auftretender Wirkungsverlust

kann so vermieden werden. Zusätzlich ist die Möglichkeit der Instabilität der Liposomen durch die Verringerung des Lezithinanteils (aufgrund der Zugabe von ÖKH) reduziert. Denn nur Lezithin selbst kann der destabilisierenden Lyssolezithinbildung unterliegen. Die damit verbundene toxische Wirkung kann somit erheblich verringert werden.

In nachfolgender Tabelle 4 ist die Stabilität von erfindungsgemäßen Zubereitungen vergleichend getestet.

Tabelle 4

Stabilität von ÖKH-haltigen Tocopherolnicotinatliposomen					
Lipid	Gesamtlipidkonzentration (mg/ml)	Teilchengröße			[nm] nach 24(Wochen)
		0	4	12	
Sojalezithin (Vgl.)	100	90±19	96±23	196±188	274±191
Sojalezithin/ÖKH 8:2 gemäß Beispiel 2(Erf.)	100	49±14	45±14	44±10	42±11

Die erfindungsgemäßen Liposomen weisen also eine deutlich bessere Lagerungsstabilität auf als vergleichbare Liposome ohne ÖKH-Zusatz.

Die von B. Kronberg et al. a.a.O beschriebene Stabilisierung von Liposomen durch Polysorbat ist nur bei kurzer Lagerungszeit nachweisbar. Insbesondere wirkstoffhaltige Liposomen sind, wie bereits beschrieben, deutlich größer und inhomogener als entsprechende Liposomen aus Sojalezithin und fettsäureverestertem Collagenhydrolysat bzw. ÖKH. Bei vierwöchiger Lagerung der Liposomen kommt es zu einer deutlichen Sedimentbildung, die für ein pharmazeutisches Produkt nicht akzeptabel ist. Polysorbat ist daher als Zusatz für wirkstoffhaltige Liposomen mit dem Ziel der Teilchengrößenverringern und der Vesikelstabilisierung nicht geeignet.

Für die topische Anwendung von Liposomenpräparationen werden der Liposomendispersion in der Regel polymere Gelbildner zur Viskositätserhöhung und damit der Verbesserung der Applikation eingesetzt. Hierzu werden insbesondere Polyacrylsäure (0,3-1,5%), Cellulosederivate (0,2-3%) und Natriumsalze von Acrylsäure-Acrylamidcopolymerisaten (z.B. im Handel erhältlich als Hostacerin PN73<sup>(R)</sup>, 1-4%ige Verwendung) in der jeweils angegebenen Konzentration eingesetzt. Arbeitet man solche Gelbildner in Liposomendispersionen aus reinem Lezithin ein, so aggregieren die Vesikel häufig aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Polymer. Die erfindungsgemäßen fettsäureveresterten Collagenhydrolysat-haltigen Vesikel zeigen dagegen überraschenderweise nur geringfügige Teilchengrößenänderungen nach Verarbeitung zu Polymergelen, wie in nachfolgender Tabelle 5 dokumentiert.

Tabelle 5

Teilchengrößenänderung nach Einarbeitung von Liposomen in Hostacerin <sup>(R)</sup> -Gele und anschließender Lagerung bei 21 °C							
Lipid	Gesamtlipidkonz. (mg/ml)	Teilchengröße vor Einarb. (nm)	Teilchengröße nach Einarbeitung (nm)	Lagerungsdauer (Wochen)			
				5	12	24	32
SL	100	95±19	108±23	110±24	117±23	124±23	142±31
SL/ÖKH	100	40±10	40±10	42±10	45±10	42±11	41±9
SL = Sojalezithin							

Die erfindungsgemäßen Liposomenzubereitungen können hergestellt werden, indem man eine Mischung aus Lezithin, vorzugsweise Ei- oder Sojalezithin zusammen mit 1-90%, insbesondere 10-50% Collagenhydrolysat, insbesondere ÖKH, sowie gegebenenfalls mit einem pharmazeutischen Wirkstoff wie oben angegeben und üblichen Zusatzstoffen in einer wäßrigen Phase bei einem geeigneten pH-Wert,

vorzugsweise 5-7, dispergiert. Die erhaltene Dispersion kann anschließend vorzugsweise in einem Hochdruckhomogenisator zerkleinert und homogenisiert werden.

Weiterhin ist es bevorzugt, die genannte Mischung aus Lezithin, Collagenhydrolysat und wahlweisen Zusätzen sowie gegebenenfalls pharmazeutischen Wirkstoffen als ethanolische Lösung in eine wäßrige Phase zu injizieren (Ethanolinjektion).

Anschließend kann die Dispersion mit üblichen Mengen eines geeigneten Gelbildners, vorzugsweise mit einem der oben beschriebenen, vermischt werden. Das Gel wird dabei in üblicher bekannter Weise bereit.

Besonders bevorzugt zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zubereitungen sind Mischungen aus Ei- oder Sojalezithin mit Collagenhydrolysat, insbesondere ÖKH, sowie den genannten Gelbildnern und Wirkstoffen, sowohl durch Hochdruckhomogenisierung als auch im Wege der Ethanolinjektion.

Wahlweise können übliche Zusatzstoffe, wie beispielsweise ein Antioxidans, z.B. Vitamin E oder Butylhydroxytoluol, und Konservierungsmittel wie Phenoxethol, Sorbinsäure, Kathon CG oder Parabene in üblichen Mengen zugesetzt werden.

Die auf diese Weise hergestellten wirkstoffhaltigen Liposomenzubereitungen weisen eine Vesikelgröße von etwa 20 bis 150 nm, vorzugsweise 20 bis 70 nm, auf. Sie eignen sich insbesondere zur topischen Anwendung - je nach Wirkstoff - als Dermatologika oder Kosmetika. Dabei ist gegenüber bisher bekannten Produkten eine Steigerung der therapeutischen Aktivität zu verzeichnen, da aufgrund des geringeren Vesikeldurchmessers eine vermehrte Interaktion mit den Zellen erfolgt und ferner auch die Stabilität der Zubereitung erhöht ist, so daß eine langanhaltende gleichbleibende Wirksamkeit ohne toxische Nebenwirkungen gewährleistet ist.

Ferner können die erfindungsgemäßen Zubereitungen einfach hergestellt werden, wobei die genannten Vorteile bei Verzicht auf hydrierte Lipide genutzt werden können.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung.

#### Beispiel 1

##### Herstellung eines ÖKH-haltigen Liposomengels mittels Hochdruckhomogenisator

In ein geeignetes Gefäß werden 80 g Sojalezithin, 9 g Phenoxyethanol und 45 g Ethanol unter Rühren auf 50 °C erwärmt. In die klare homogene Flüssigkeit werden 400 mg Butylhydroxytoluol, 20 g ÖKH und 745,6 g hypotoner Puffer, pH 6,5, gegeben. Die entstandene Lipiddispersion (900 g) wird mit einem Hochdruckhomogenisator behandelt ( $1,1 \cdot 10^8$  Pa, 40 min) und anschließend durch eine Membran (0,45 µm) filtriert.

Zur Herstellung eines Gels werden 5 g Polyacrylsäure (z.B. Carbopol<sup>(R)</sup> 984), 1 g Phenoxyethanol und 8,8 g TRIS in einer Mischung aus 5 g Ethanol und 80,2 g Phosphatpuffer pH 6,5 dispergiert. Nach einem Tag Ausquellung wird das Gelkonzentrat mit der oben beschriebenen Liposomendispersion vermischt.

#### Beispiel 2

##### Herstellung eines ÖKH-haltigen Tocopherolnicotinat-Liposomengels mittels Hochdruckhomogenisator

In ein geeignetes Gefäß werden 80 g Sojalezithin, 20 g  $\alpha$ -Tocopherolnicotinat, 7,5 g Phenoxyethanol und 37,5 g Ethanol unter Rühren auf 50 °C erwärmt. In die klare homogene Flüssigkeit werden 400 mg Butylhydroxytoluol, 20 g ÖKH und 584,6 g hypotoner Phosphat-Puffer pH 6,5 gegeben. Die entstandene Lipiddispersion (750 g) wird mit einem Hochdruckhomogenisator behandelt ( $1,1 \cdot 10^8$  Pa, 40 min) und anschließend durch eine Membran (0,45 µm) filtriert (vgl. Tabelle 4).

Zur Herstellung eines Gels werden 25 g Hostacerin<sup>(R)</sup> und 2,5 g Phenoxyethanol in einer Mischung aus 12,5 g Ethanol und 210 g Phosphatpuffer pH 6,5 dispergiert. Nach einem Tag Ausquellung wird dieses Gelkonzentrat mit der oben beschriebenen Liposomendispersion vermischt. Diese Liposomen weisen nach Lagerung bei 21 °C eine deutlich bessere Stabilität auf als vergleichbare Liposomen ohne ÖKH-Zusatz (vgl. Tabelle 5).

#### Beispiel 3

##### Herstellung eines ÖKH-haltigen Cyproteron-Liposomengels mittels Hochdruckhomogenisator

In ein geeignetes Gefäß werden 80 g Sojalezithin, 100 mg Cyproteron, 10 g Phenoxyethanol und 50 g Ethanol unter Rühren auf 50 °C erwärmt. In die klare homogene Flüssigkeit werden 400 mg Butylhydroxyto-

luol, 20 g ÖKH und 829,5 g hypotoner Phosphat-Puffer pH 6,5 gegeben. Die entstandene Lipiddispersion (990 g) wird mit einem Hochdruckhomogenisator behandelt ( $1,1 \cdot 10^8$  Pa, 40 min) und anschließend durch eine Membran (0,45  $\mu$ m) filtriert. Die hergestellten Liposomen weisen eine deutlich bessere Lagerungsstabilität auf als vergleichbare Liposomen ohne ÖKH-Zusatz.

- 5 Zur Herstellung eines Gels werden 10 g Carboxymethylcellulose unter Rühren auf 990 g Liposomendispersion aufgestreut und 24 Stunden quellen gelassen.

#### Beispiel 4

##### 10 Herstellung eines ÖKH-haltigen Tretinoin-Liposomengels mittels Hochdruckhomogenisator

In einem geeigneten Gefäß werden 200 mg Tretinoin und 400 mg Butylhydroxytoluol in 50 g Ethanol unter Rühren gelöst. In isotonen Phosphatpuffer pH 6,5 (802 g) werden 80 g Lezithin, 20 g ÖKH und 10 g Phenoxylethanol dispergiert. Die ethanolische Lösung wird unter Ultraturraxbehandlung in die wäßrige Phase  
15 eingerührt. Die entstandene Dispersion (962,5 g) wird mit einem Hochdruckhomogenisator behandelt ( $1,1 \cdot 10^8$  Pa, 40 min) und anschließend durch eine Membran (0,45  $\mu$ m) filtriert. Die hergestellten Liposomen weisen eine Teilchengröße von  $23 \pm 4$  nm auf.

Zur Herstellung eines Gels werden 12,5 g Polyacrylsäure (Carbomer 941<sup>(R)</sup>) und 25 g TRIS unter Rühren in der Liposomendispersion dispergiert und 24 Stunden quellen gelassen.

20

#### Beispiel 5

##### Herstellung eines ÖKH-haltigen Croconazol-Liposomengels mittels Hochdruckhomogenisator

25 In einem geeigneten Gefäß werden 1 g Croconazol in 10 g Ethanol unter Rühren gelöst. Die ethanolische Lösung wird unter Ultraturraxbehandlung in die wäßrige Phase, enthaltend Lezithin, ÖKH, Phenoxethol, eingerührt. Die entstandene Dispersion wird mit einem Hochdruckhomogenisator behandelt ( $1,1 \cdot 10^8$  Pa, 40 min) und anschließend durch eine Membran (0,45  $\mu$ m) filtriert.

Zur Herstellung eines Gels werden 12,5 g Polyacrylsäure (Carbomer 941<sup>(R)</sup>) und 25 g TRIS unter  
30 Rühren in der Liposomendispersion dispergiert und 24 Stunden quellen gelassen. Der pH-Wert des Gels liegt zwischen 7 und 8. Die Teilchengröße der darin enthaltenen Liposomen beträgt  $22 \pm 3$  nm.

#### Beispiel 6

##### 35 Herstellung einer ÖKH-haltigen Liposomendispersion mittels Ethanolinjektion

2,4 g Sojalezithin und 2,4 g ÖKH werden in 20 ml Ethanol gelöst und mittels einer geeigneten Spritze in 80 ml isotonen Puffer pH 6,5 injiziert. Die Injektion erfolgt in einem Ultraschallbad zur besseren Verteilung der ethanolischen Lösung. Zur Reinigung wird die Dispersion durch eine Membran (0,45  $\mu$ m) filtriert. Die  
40 Endkonzentration beträgt 4,8 % Lipid und 20 % Ethanol. Auch bei dieser Herstellungstechnik werden im Vergleich zu reinen Sojalezithinliposomen kleinere Vesikel erhalten (vgl. Tabelle 3).

#### Beispiel 7

##### 45 Herstellung Hexachlorophenhaltiger Liposomen mittels Ethanolinjektion

1,0 g Hexachlorophen, 0,2 g Tocopherol, 2,5 g Sojalezithin und 2,5 g ÖKH werden in 20 g Ethanol gelöst und mittels einer geeigneten Spritze in 74 ml Citrat/Phosphat-Puffer pH 5,5 (mit 0,2 % Sorbinsäure/Kaliumsorbat) unter Ultraschallbehandlung injiziert. Zur Reinigung wird die Dispersion durch  
50 eine Membran (0,45  $\mu$ m) filtriert. Die Endkonzentration beträgt 1% Hexachlorophen, 5,0% Lipid und 20% Ethanol, die Teilchengröße 70-135 nm. Aus der Liposomendispersion wird mit 1 g Polacrylsäure (Carbopol 984<sup>(R)</sup>) ein Gel bereitet. Die Teilchengröße der Liposomen in der Gelzubereitung beträgt 100-110 nm.

#### Patentansprüche

55

1. Liposomenzubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß die Vesikel eine geringe Teilchengröße haben und eine Mischung aus einem oder mehreren Lezithinen mit 1-90% fettsäureverestertem Collagenhydrolysat enthalten.

2. Liposomenzubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vesikel 10-50% fettsäureverestertes Collagenhydrolysat enthalten.
3. Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das  
5 Lezithin Soja- oder Eilezithin ist.
4. Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das fettsäureveresterte Collagenhydrolysat ölsäureverestertes Collagenhydrolysat ist.
- 10 5. Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Vesikel eine Größe von 20 bis 150 nm, vorzugsweise 20 bis 70 nm, aufweisen.
6. Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich polymere Gelbildner enthält.
- 15 7. Liposomenzubereitung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Gelbildner ausgewählt ist aus Polyacrylsäure, einem Cellulosederivat und Natriumsalzen von Acrylsäure-Acrylamid-Copolymerisaten.
- 20 8. Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen therapeutischen Wirkstoff enthält.
9. Liposomenzubereitung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ausgewählt ist aus Hexachlorophen, Tretinoin, Minocyclin, Meclocyclin,  $\alpha$ -Tocopherolnicotinat, Tromantadin-Base, Croconazol, Cyproteron, Cyproteronacetat, Corticoiden, 2-tert.-Butyl-4-cyclohexylphenylnikotinat-N-oxid,  
25 Corticosteroiden, Androgenen, Ethinylöstradiol, nichtsteroidalen Antiphlogistika, Dihydropyridinen, Spironolacton, Erythromycinester, lipophilen Lokalanästhetika, Östradiolester oder lipophilen Antihistaminika.
- 30 10. Verfahren zur Herstellung einer Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) das Lezithin mit 1 bis 90%, vorzugsweise 10 bis 50%, fettsäureverestertem Collagenhydrolysat und gegebenenfalls mit einem pharmazeutischen Wirkstoff sowie üblichen Zusatzstoffen in einem geeigneten Lösungsmittel bei einem geeigneten pH-Wert dispergiert,
  - 35 b) die Dispersion gemäß Schritt a) gegebenenfalls mit einem geeigneten Gelbildner vermischt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Schritt a) erhaltene Dispersion in einem Hochdruckhomogenisator zerkleinert und homogenisiert wird.
- 40 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß zur Dispergierung gemäß Schritt a) eine Mischung aus dem Lezithin, dem fettsäureveresterten Collagenhydrolysat und gegebenenfalls pharmazeutischen Wirkstoff und üblichen Zusatzstoffen und Ethanol in eine wäßrige Phase injiziert wird.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Lezithin Soja-  
45 oder Eilezithin verwendet.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als fettsäureverestertes Collagenhydrolysat ölsäureverestertes Collagenhydrolysat verwendet.
- 50 15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß gemäß Schritt a) als Wirkstoff Hexachlorophen, Tretinoin, Minocyclin, Meclocyclin,  $\alpha$ -Tocopherolnicotinat, Tromantadin-Base, Croconazol, Cyproteron, Cyproteronacetat, Corticoiden, 2-tert.-Butyl-4-cyclohexylphenylnikotinat-N-oxid, Corticosteroiden, Androgenen, Ethinylöstradiol, nichtsteroidalen Antiphlogistika, Dihydropyridinen, Spironolacton, Erythromycinester, lipophilen Lokalanästhetika, Östradiolester oder lipophilen Antihistaminika  
55 verwendet werden.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß gemäß Schritt b) der Dispersion ein Gelbildner auf Basis Polyacrylsäure, eines Natriumsalzes eines Acrylsäure-Acrylamidco-

polymerisats oder eines Cellulosederivats zugesetzt wird.

17. Verwendung einer Liposomenzubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines topischen Mittels zur kosmetischen oder dermatologischen Anwendung beim Menschen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 92 10 5737

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	WO-A-8 706 460 (L,OREAL) * Seite 3, Zeile 8 - Seite 6, Zeile 32 * * Seite 11, Zeile 1 - Seite 12, Zeile 11 * * Seite 13, Zeile 28 - Seite 18, Zeile 22 * * Seite 21 - Seite 22; Beispiel 3 * ---	1-17	A61K9/127 A61K7/00
X	WO-A-9 012 565 (NATTERMANN, A.&CIE. GMBH) * das ganze Dokument * *insbesondere Seite 3, Zeilen 14-19* -----	1-17	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemerit DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 24 JULI 1992	Prüfer BENZ K. F.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 150 (01.82 (P0403))